

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Tomo Svaguša

**Povezanost serumske koncentracije
željeza s ekspresijom BMP6 molekula
u jetri- moguća uloga u
hemokromatozi**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2014.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za mineralizirana tkiva, Zavoda za anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof.dr.sc. Slobodana Vukičevića u sklopu Tehnologijskog projekta „Uloga TSH u modelu osteoporoze i u bolesnica sa smanjenom koštanom masom“, voditelj prof.dr.sc. Slobodan Vukičević i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2010./2011., te je korišten kao ekvivalent diplomskog rada u akademskoj godini 2013./2014.

POPIS KRATICA:

BMP6- koštani morfogenetski protein 6

Hamp- gen za hepcidin

TGFβ- transformirajući čimbenik rasta β

cDNA- komplementarna deoksiribonukleinska kiselina

mRNA- glasnička ribonukleinska kiselina

WT- od engl. wild type

KO- od engl. knocked out

MeCN- acetonitril

AcOH- octena kiselina

PBS- od engl. phosphate buffered saline

SADRŽAJ RADA:

- a) Sažetak
- b) Summary
- c) Uvod
- d) Hipoteza
- e) Opći cilj i specifični ciljevi rada
- f) Materijali i metode
- g) Rezultati
- h) Rasprava
- i) Zaključci
- j) Zahvale
- k) Literatura
- l) Životopis

SAŽETAK

Tomo Svaguša

POVEZANOST SERUMSKE KONCENTRACIJE ŽELJEZA S EKSPRESIJOM BMP6 MOLEKULA U JETRI- MOGUĆA ULOGA U HEMOKROMATOZI

Smatra se da ključnu fiziološku ulogu u regulaciji homeostaze željeza ima cirkulirajući peptidni hormon hepcidin. Njegova ekspresija u stanicama jetre *in vivo* potaknuta je unutarstaničnim signalnim putem molekule BMP6.

Pri induciranom opterećenju organizma željezom, u jetri WT miševa zabilježen je značajan porast ekspresije *Bmp6* gena, što je u korelaciji s porastom ekspresije hepcidina u jetri. Histološka građa jetre WT miševa je očuvana. Suprotno tome, u pokusima s miševima s izbačenim genom za BMP6 (*Bmp6* KO), pri induciranom opterećenju željezom nalazimo masivno nakupljanje željeza u tkivu te morfološke promjene jetre koje odgovaraju hemokromatozi. Rezultati govore u prilog tezi o središnjoj ulozi BMP6 i hepcidina u homeostazi željeza. Jetra ima središnju ulogu u sintezi BMP6. S obzirom na to da su poremećaji metabolizma željeza od velikog kliničkog značaja, daljnja istraživanja trebala bi biti usmjerena na razvoj biomarkara za dijagnostiku i praćenje tijeka bolesti.

Ključne riječi: BMP6, hepcidin, željezo, hemokromatoza, jetra

SUMMARY

Tomo Svaguša

CORRELATION BETWEEN SERUM IRON LEVELS AND EXPRESSION OF BMP6 IN LIVER- THE POSSIBLE ROLE IN HEMOCHROMATOSIS

A circulating peptide hormone hepcidin is considered as a key-regulator of the iron homeostasis. In the liver cells, its expression *in vivo* is induced by a BMP6 intracellular signaling pathway.

In the liver of WT mice fed an iron-supplemented diet, we detected a significant increase in the expression of *Bmp6* gene which also correlated with the liver expression of *hepcidin*. A histological structure of the liver tissue was unharmed. On the other hand, in the liver of *Bmp6* KO mice fed an iron-supplemented diet we detected a massive iron overload in the liver tissue and the morphological characteristics of hemochromatosis. The results confirmed a hypothesis of the central role of BMP6 and hepcidin in the regulation of the iron homeostasis. Also, we concluded that the synthesis of BMP6 takes place mainly in the liver. As the iron metabolic disorders are rather frequent and clinically important, further researches should be focused on the possible development of biomarkers for the diagnosis and monitoring of the diseases.

Key words: BMP6, hepcidin, iron, hemochromatosis, liver

UVOD

Željezo je jedan od esencijalnih elemenata u tragovima. U organizmu odraslog čovjeka nalazi se u količini od 4–5 grama, uglavnom u sastavu hemoglobina cirkulirajućih eritrocita (oko 2.5 grama), citokroma c unutrašnje membrane mitohondrija i citokrom oksidaze, a sudjeluje u procesu pohrane i prijenosa molekularnog kisika, prijenosa elektrona tijekom staničnog disanja i stvaranja slobodnih radikala kisika (S. Gamulin, M. Marušić, Z. Kovač i sur., 2011).

Željezo se u probavnom sustavu najvećim dijelom apsorbira iz duodenuma, a s obzirom na to da ne postoji adekvatan način izlučivanja njegovoga viška standardnim fiziološkim putevima (bubrezi, pluća, koža), apsorpcija željeza iz duodenuma smatra se primanim homeostatskim regulatorom količine željeza u organizmu. Naime, smanjenjem apsorpcije, sprječava se nagomilavanje željeza u organizmu, dok se u određenih vrsta anemija, pri hemolizi ili kod većeg gubitka krvi, apsorpcija povećava (S. Gamulin, M. Marušić, Z. Kovač i sur., 2011).

Željezo se apsorbira u reduciranom obliku (Fe^{2+}) ili u sastavu hema, na apikalnoj membrani enterocita duodenuma. U citoplazmi enterocita djelomično se pohranjuje u obliku feritina, dok se preostali dio izlučuje u krv pomoću proteina feroportina, koji se nalazi na bazolateralnoj membrani enterocita (McKie AT, Barlow DJ, 2004.). Feroportin se također nalazi na membrani stanica retikuloendotelnog sustava jetre i slezene te stanica placente. U tom je slučaju važan zbog recikliranja željeza iz fagocitiranog staničnog detritusa eritrocita (20–25 mg/dan) (Knutson M., Wessling-Resnick M., 2003.). Budući da pri fiziološkom pH željezo nije topivo u plazmi, ono se prenosi u obliku transferina (normalna zasićenost je oko 30 %). Kada se premaši kapacitet vezivanja željeza za transferin, ono se nađe u slobodnom obliku u plazmi te vrlo lako ulazi u jetrene stanice i srčane miocite procesom olakšane difuzije ili nekim drugim, još nedovoljno poznatim mehanizmom (Park, C.H., Valore, E.V., Waring, A.J., Ganz, T., 2001.).

Nedavno je razjašnjeno da ključnu fiziološku ulogu u regulaciji apsorpcije željeza ima cirkulirajući peptidni hormon hepcidin (Pigeon C., Ilyn G., Leroyer P. i sur., 2001.). Sintetiziran u jetri, hepcidin se izlučuje i veže na protein feroportin, uzrokujući njegovu internalizaciju i degradaciju unutar stanice te na taj način smanjuje otpuštanje željeza u krv, kako iz enterocita, tako i iz stanica retikuloendotelnog sustava (E. Kemna, H. Tjalsma, H. Willems, D. Swinkels, 2009.).

Produkcija hepcidina regulirana je količinom cirkulirajućeg i pohranjenog željeza, eritropoetskom aktivnošću koštane srži te upalnim procesima (Kraus, A. i sur., 2000.). Opterećenje željezom dovodi do povećane ekspresije hepcidina u jetri, ukazujući na prisutnost kompenzacijskih mehanizama koji dovode do ograničavanja apsorpcije željeza (Park, C.H., Valore, E.V., Waring, A.J., Ganz, T., 2001.).

Također, pojačana ekspresija hepcidina dovodi se u vezu s patogeneзом anemije kronične bolesti, koja se često nalazi kod pacijenata s autoimunskim i malignim te kroničnim bubrežnim bolestima. Smatra se da pojedini proupalni citokini (IL-6) povećavaju ekspresiju hepcidina u jetri te da je to središnji događaj u razvoju ovog oblika anemije (Nemeth, E. i sur., 2004.).

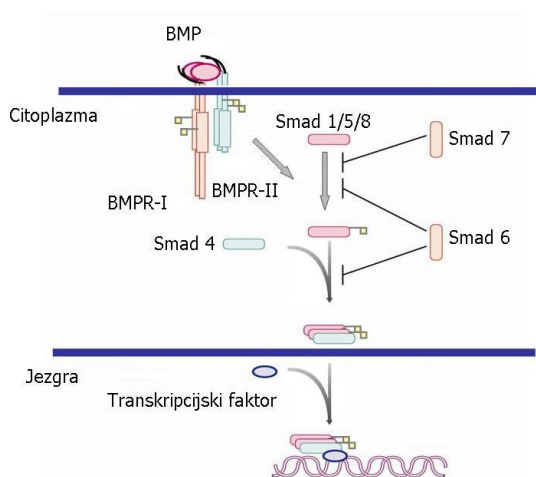
Poremećaji metabolizma željeza imaju veliku kliničku važnost. Jedan od takvih poremećaja je hemokromatoza, kod koje dolazi do nakupljanja željeza u raznim tkivima i organima, a u vezi je s istraživanim mehanizmima regulacije u ovom radu. Hereditarna hemokromatoza je heterogena skupina bolesti, uzrokovana mutacijama oba alela jednog od sljedećih gena : *hepcidin (HAMP)*, *HFE*, *hemojuvelin (HJV)*, *transferin receptor 2 (TFR2)*. Mehanizam djelovanja HFE nije poznat, a za HJV (pripada HLA molekulama razreda I) je poznato da djeluje kao koreceptor BMP6 u jetri. Smatra se da je TFR2 uključen u mehanizme regulacije interakcijom s HFE molekulom i hepcidinom. Mutacija gena odgovornih za nastanak

hemokromatoze uzrokuje abnormalno povećanje apsorpcije željeza u crijevnoj sluznici (Camaschella C., Roetto A., Cali A i sur., 2000.). Glavna morfološka značajka hemokromatoze jest odlaganje željeza u obliku hemosiderina u brojnim tjelesnim organima. U jetri se hemosiderin nakuplja u citoplazmi jetrenih stanica, u Kupfferovim stanicama, epitelu žučnih kanalića i vezivu. Tijekom niza godina razvija se mikronodularna ciroza kao rezultat stimulacije umnožavanja veziva željezom te vezivnog zacjeljivanja nekroze jetrenih stanica. Ozbiljna komplikacija bolesti jest razvoj hepatocelularnoga karcinoma. U gušterači se željezo nakuplja u epitelu acinusa egzokrinog dijela, u stanicama Langerhansovih otočića te u intersticiju. Razvija se difuzna intersticijska fibroza te sekundarni dijabetes (I. Damjanov, S.Jukić i M. Nola, 2011.). U srcu se hemosiderin nakuplja u mišićnim vlaknima. Oštećenje miocita prati fibroza čija je klinička posljedica razvoj restriktivne kardiomiopatije (Oudit GY, Sun H, Trivieri MG i sur., 2003.). U zglobovima se hemosiderin nakuplja u sinovijalnoj membrani. To uzrokuje oštećenje hrskavice koje nalikuje na uloge i artritis. Od endokrinih žlijezda, najčešće su zahvaćene štitnjača i paratireoidne žlijezde (I. Damjanov, S. Jukić i M. Nola, 2011.).

U novije vrijeme sve je više radova koji proučavaju utjecaj koštanih morfogenetskih proteina (BMP) na ekspresiju hepcidina. Koštani morfogenetski proteini pripadaju nadobitelji transformirajućeg čimbenika rasta β (TGF β) za čije je predstavnike svojstveno da reguliraju brojne događaje tijekom embrionalnog razvoja (Hogan 1996, Kingsley 1994a, Kingsley 1994b). BMP molekule lokalizirane su u mnogim tkivima tijekom razvoja embrija i postnatalnog života (Vukičević S., 1995). Ekspresija njihovih gena otkrivena je i u mnogim mekim tkivima te je dokazan njihov utjecaj na različite tipove stanica, kao što su epitelne stanice, monociti, plazma stanice, mezenhimalne i živčane stanice. Koštani morfogenetski proteini višestruko su uključeni u regulaciju rasta, diferencijacije i apoptoze. Do danas je

poznato više od 40 koštanih morfogenetskih proteina, koje dijelimo u podskupine na osnovi sličnosti slijeda njihovih aminokiselina (Sakou 1998).

Smatra se da se u jetrenim stanicama ekspresija hepcidina potiče upravo preko unutarstaničnog signalnog puta koji započinje vezanjem BMP molekula na receptor serin – treonin kinazu (receptor s kinaznom aktivnošću) smješten na površini hepatocita (J. L. Babitt, F. W. Huang, Yin Xia i sur., 2007.). Nastaje kompleks receptor – ligand, koji procesom fosforilacije aktivira citoplazmatske efekte Smad1, Smad5 i Smad8, čime se signal amplificira (slika 1). Aktivirane molekule tvore heteromerni kompleks s medijatorom Smad4, ulaze u jezgru, vežu se na specifične slijedove DNA, međudjeluju s drugim proteinima koji se vežu na DNA i privlačenjem aktivatora ili represora transkripcije moduliraju transkripciju ciljnih gena (D. Meynard, L. Kautz, V. Darnaud i sur., 2009.).



Slika1: Signalni put BMP-a. Nakon aktivacije BMP receptora, fosforiliraju se Smad 1, Smad 5 ili Smad 8 te stvaraju komplekse s molekulom Smad 4. Takvi kompleksi premještaju se u jezgru, gdje se neposredno ili zajedno s određenim transkripcijskim čimbenicima vežu na promotorske regije ciljnih gena.

Iako je *in vitro* dokazana uloga molekula BMP2 , BMP4 i BMP 9 u ovom procesu , njihova uloga *in vivo* ostaje nejasna. Međutim, čini se kako BMP6 ima značajnu ulogu u regulaciji *in vivo*, budući da je ekspresija *Bmp6* i *Hamp* mRNA povećana pri opterećenju organizma željezom. Tome u prilog govori i dokazana povećana koncentracija fosforiliranih molekula Smad1, Smad5, Smad8 i Smad 4 u tkivu jetre *Bmp6* WT miševa, dok takvi rezultati nisu dobiveni kod miševa s izbačenim genom za BMP6 (D. Meynard, L. Kautz, V. Darnaud i sur., 2009.). Također, u pojedinim pokusima (Wang R.H., Li C., Xu X. i sur.) dokazano je da *Smad4* KO miševi pokazuju potpuni nedostatak hepcidina i razvijaju hemokromatozu, što dodatno govori u prilog tezi o povezanosti BMP signalnog puta i ekspresije hepcidina. Mehanizmi pomoću kojih BMP6 prepoznaju željezo još su uvijek nepoznati.

Nedavno je objavljeno da duodenum, a ne jetra predstavlja glavni izvor BMP6 nakon induciranog opterećenja željezom u miševa (S. Arndt, U. Maegdefrau i sur., 2009.). Pored toga, pokazali su značajno povećanje razine BMP6 u serumu nakon aplikacije željeza imunodetekcijskim metodama. S obzirom na navedene rezultate, u ovom radu istražili smo utjecaj povećane koncentracije željeza na ekspresiju *Bmp6* i *hepcidina* u jetri i tankom crijevu u miša. Pri tome smo koristili WT i *Bmp6* KO miševe za usporedbu i praćenje morfoloških promjena na tkivima uzrokovanih akumulacijom željeza. Pored toga, pratili smo i utjecaj induciranog opterećenja željezom na ekspresiju *Bmp7* gena.

MATERIJALI I METODE

Životinjski eksperimentalni modeli

U pokusima smo koristili miševe divljeg tipa i *Bmp6* knock out miševe te štakore soja Sprague Dawley, stare tri mjeseca. Miševima je intravenozno injicirano željezo (0.2 g / kg tjelesne mase, Venofer, željezo-sukroza injekcija ili 1% - tna otopina sukroze u PBS-u). Eksperimentalne grupe sastojale su se od 6 miševa, miješanih spolova. Na kraju pokusa, životinje su žrtvovane, a pojedina tkiva korištena za analizu 4, 8, 24 i 48 sati nakon injiciranja željeza. Izabrali smo navedene vremenske intervale za praćenje ekspresije *Bmp6 in vivo* na temelju postojećih podataka u literaturi. *Bmp6* KO miševi su soja 129Sv/C57 (ljubaznošću Elizabeth J. Robertson), a uzgojeni su na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na standardnoj dijeti (4RF21, Mucedola, Italija), uz unos željeza od 180 mg/ kg tjelesne mase.

Kako bismo utvrdili najnižu dozu željeza, potrebnu za porast ekspresije *Bmp6*, *Bmp7* i *Hamp* mRNA u jetri, štakorima starima tri mjeseca smo intravenozno injicirali željezo-sukroza otopinu (Venofer), u dozama od 50, 100 i 200 mg/kg tjelesne mase. Životinje su žrtvovane nakon tri te nakon šest sati, a krv i tkivo jetre smo koristili za mjerenje parametara željeza te ekspresiju *Bmp6*, *Bmp7* i *Hamp*.

Tijekom pokusa, sa životinjama se postupalo prema propisanim etičkim standardima.

Prikupljanje krvi miša

Krv smo skupili iz retroorbitalnog spleta i pohranili u epruvetama (BD Microtainer) s K2 EDTA (BD Vacutainer), nakon čega smo izdvojili plazmu prema uputama proizvođača.

Bojenje Berlinskim modrilom

Serijski rezovi jetrenog tkiva, uklopljeni u parafin, obojeni su berlinskim modrilom (5%-tna otopina željezovog ferocijanata i 5%-tna otopina HCl, proizvodi Kemika) i nuclear red (Kernechtrot) bojom (Chromagesellschaft), prema standardnim procedurama.

Imunohistokemijsko bojenje

Tkiva *Bmp6* ^{-/-} i WT miševa fiksirali smo u 10% -tnoj otopini formalina te uklopili u parafin. Načinjeni su rezovi debljine 5 µm, deparafinizirani u ksilolu i hidrirani destiliranom vodom. Serijski rezovi za klasičnu histološku analizu bojeni su hematoksilin–eozinom. Za imunohistokemijsku analizu korišten je sustav detekcije imunoperoksidazom (Zymed, San Francisco, CA). Za imunohistokemijsku reakciju korišteno je BMP6 poliklonsko protutijelo (proizvedeno u Laboratoriju za mineralizirana tkiva) na cijelu BMP6 molekulu.

Analiza genske ekspresije

Iz jetre pokusnih miševa i štakora izolirana je molekula RNA, prema protokolu TRIzol (Invitrogen). Ukupna količina izolirane RNA izmjerena je spektrofotometrijski u uređaju Biofotometar (Eppendorf). Iz 1 µg RNA sintetizirana je cDNA koristeći program Super Script III First-Strand Synthesis System (Invitrogen), prema uputama proizvođača. Reakcije amplifikacije provedene su u uređaju GeneAmp 4800 (PerkinElmer Life Sciences). Ekspresiju gena *Bmp6*, *Bmp7* i *Hamp* mjerili smo pomoću LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green kita u uređaju LightCycler (Roche Diagnostics). Za normalizaciju smo koristili βaktin i Gapdh mRNA. Za relativnu kvantifikaciju genske ekspresije koristili smo komparativnu CT metodu. Rezultati se prikazuju kao promjena ekspresije (engl. fold change) u odnosu na komparativnu razinu ekspresije. Popis korištenih početnica nalazi se u tablici 1.

Tablica 1: *Popis početnica (F= forward, R= reverse).*

<i>Bmp7</i> (miš i štakor)	F:ACGGACAGGGCTTCTCCTAC R: ATGGTGGTATCGAGGGTGGAA
<i>Beta aktin</i> (miš)	F:GGGAAATCGTGCGTGACATT R: GCGGCAGTGGCCATCTC
<i>GAPDH</i> (štakor)	F:ATGATTCTACCCACGGCAAG R: CTGGAAGATGGTGATGGGTT
<i>Hepcidin</i> (štakor)	F:AGCCTGAGCAGCGGTGCCTA R: CGGAGGGGAGGCAGTGTGTTG
<i>Bmp6</i> (miš)	F:TCCCCACATCAACGACACCA R: TCCCCACCACACAGTCCTTG
<i>Bmp6</i> (štakor)	F:CAGTGCGTCCCCACTGACCA R: TCCCCACCACACAGTCCTTG

SDS elektroforeza i Western blot

Za proteinsku analizu korištena je metoda SDS-PAGE elektroforeza (od engl. Sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis) na 10%-tnom gelu prema Laemmlijevoj metodi. Nakon elektroforeze, jedan dio gela je prenesen na nitroceluloznu membranu , a drugi je dio bojen Coomassie Brilliant Blue bojom. Bojenje je provedeno standardnim postupkom (0.1 % CBB u 45 % metanola i 10% octene kiseline), 30 minuta , pri standardnoj temperaturi. Dio gela koji je prenesen na nitroceluloznu membranu inkubiran je sa zečjim BMP6 poliklonskim protutijelom (rabbit anti BMP6, proizvedeno u Laboratoriju za mineralizirana tkiva), a kao sekundarno protutijelo korišteno je protutijelo konjugirano s alkalnom fosfatazom (Invitrogen), (Simic P.,Culej JB,Grgurević L. , Drača N. i sur.).

Digestija u gelu

Proteini su reducirani i alkilirani u gelu. Reducirani su u otopini od 10 mM DDT-a u 50 mM amonijevog bikarbonata te alkilirani s 50 mM jodacetamida u 50 mM amonijevog bikarbonata pri sobnoj temperaturi i u mraku. Komadići gela dva su puta ispirani u otopini od 50 mM amonijevog bikarbonata, 50 % acetonitrila i dehidrirani u 100% -tnom etanolu te sušeni u vakuum centrifugi. Rehidrirani su otopinom od 12.5 ng/μg tripsina u 50 mM ABC na ledu, te inkubirani preko noći na 37 stupnjeva. Peptidi su ekstrahirani inkubacijom s 30 %-tnim acetonitrilom, 3 % TFA te 100 % acetonitrilom (MeCN). Odsoljeni su i pročišćeni od gela Stage Tip tehnikom (Olsen JV i sur., 2005.).

Čišćenje i odsoljavanje peptida (Stage-tips)

Peptidi su odsoljeni i pročišćeni od komadića gela StageTip tehnikom (Rappsilber, Mann, Ishihama, 2007). C18 tip je smočen metanolom. Netom što je prošla otopina metanola, tip je uravnotežen otopinom „A“ (0,5% AcOH). Peptidi su zakiseljeni i nanjeni na tip. Peptidi su isprani otopinom „A“, te eluirani otopinom „B“ (0,5% AcOH, 80% MeCN). Acetonitril je uparen vakuum centrifugom.

Masena spektrometrija

Peptidi su razdvojeni tekućinskom kromatografijom te analizirani spektrometrijom masa (LC-MS) . Korišten je sustav Agilent 1100 nanoflow HPLC System(Agilent Technologies) koji je povezan s LTQ- Orbitrap spektrometrom (Thermo Scientific) putem nano elektrosprej ionizacijskog vrela (Proxeon Biosystems) . Peptidi su propuštani na HPLC koloni u otopini „A“ (0.5% octena kiselina) te eluirani 70 minuta linearnim gradijentom 10-60% -tne otopine „B“ (80% acetonitril , 0.5% octena kiselina) pri protoku od 250 nL/ min. (Olsen JV i sur.,2005 ; Grgurević L. i sur. , 2007.).

Procesiranje podataka i pretraživanje baze sekvenci

„Peak list“-e pripremljene su pomoću Quant modula MaxQuant software-a, verzije 1.0.12.22. (Cox i Mann, 2008) Baza humanih peptidnih sekvenci (Intergr8, izdanje 108) pretražena je pomoću Tandem software-a, verzije 2010.01.01.4 (Craig i Beavis, 2004), a zatim je na isti način pretražena i „mamac“ baza, dobivena preokretanjem svih izvornih sekvenci. Parametri pretraživanja bili su sljedeći: odstupanje mase peptida, 10 ppm; odstupanje mase fragmenata, 440 ppm; stalna promjena mase, karbaimidometilacija cisteina; upitna promjena mase, oksidacija metionina. Ostali parametri bili su uobičajeni za pretraživač. Valjanost PSM-ova određena je pomoću Qvality software-a, verzije 1.11.(Kall i sur. 2009) Tandem „očekivane vrijednosti“ pridružene su q i PEP vrijednostima. Valjanim PSM-ovima proglašeni su oni s Tandem „očekivanim vrijednostima“ koje odgovaraju q vrijednosti 0.01 ili manje.

Bioinformatička analiza

Valjani PSM-ovi učitani su u ProteinCenter software (Proxeon). Nakon grupiranja prema dijeljenim peptidima, uzorci su uspoređeni međusobno. Zatim su zajedničke grupe profilirane prema emPAI vrijednosti unutar genskih ontoloških grupa.

Statistička analiza

Svi podaci su prikazani kao dobivena vrijednost \pm statistička razlika. Rezultate između pojedinih grupa uspoređivali smo pomoću studentovog t-testa. Rezultati se smatraju statistički značajnima kada je pogreška manja od 0,05 ($P < 0,05$).

HIPOTEZA

Pretpostavlja se da inducirano opterećenje željezom dovodi do porasta ekspresije *Bmp6* i *hepcidina* u jetri te da su njihovi signalni putevi i mehanizmi djelovanja međusobno povezani.

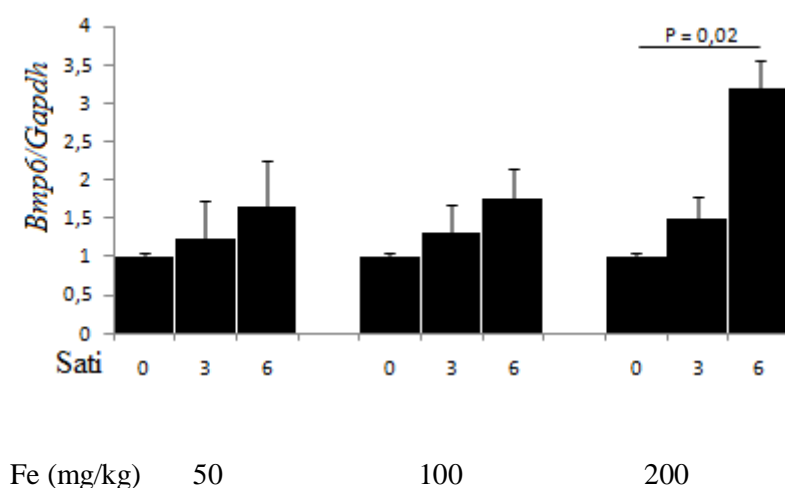
OPĆI CILJ I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

1. Utvrditi kako povećana koncentracija željeza u krvi miša utječe na ekspresiju *Bmp6* i *hepcidina* u jetri te pratiti morfološke promjene na tkivima pri opterećenju željezom (usporedbom WT i *Bmp6* KO miševa).
2. Istražiti postoji li pri istim uvjetima povećana ekspresija *Bmp6* u tankom crijevu.
3. Provjeriti dovodi li inducirano opterećenje željezom do promjena u ekspresiji *Bmp7* u jetri.
4. Poboljšati razumijevanje patogeneze i patofiziologije hemokromatoze.

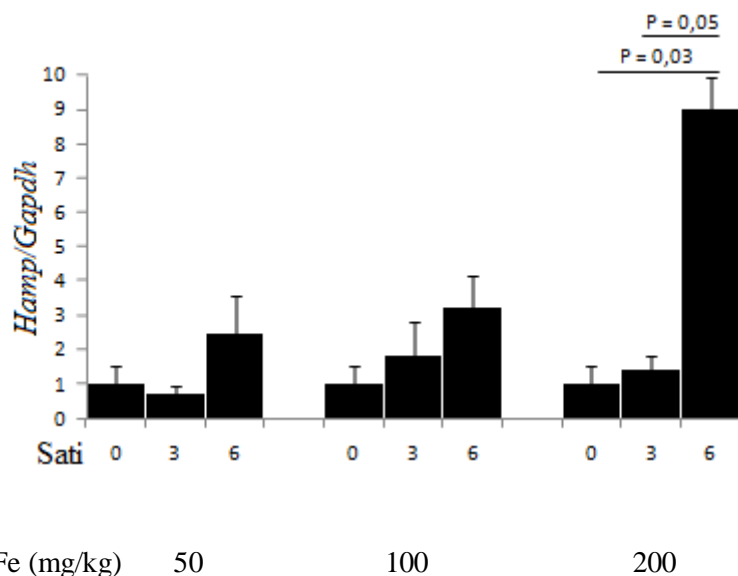
REZULTATI

Utjecaj željeza na ekspresiju *Bmp6* i *hepcidina* u jetri

Štakorima soja Sprague Dawley intravenski je primijenjeno željezo u tri različite koncentracije (50, 100, i 200 mg/kg). Jetra je izolirana neposredno nakon aplikacije željeza te nakon tri i šest sati. Pri koncentracijama od 50 i 100 mg/kg ne dolazi do statistički značajnog porasta ekspresije *Bmp6* i *hepcidina* u jetri. Šest sati nakon intravenske primjene željeza, pri koncentraciji od 200 mg/kg, zamijećen je statistički značajan porast ekspresije *Bmp6* i *hepcidina* u jetri (slike 2 i 3).



Slika 2: Utjecaj koncentracije intravenski primijenjenog željeza na ekspresiju *Bmp6* u jetri. Graf prikazuje odnos između i.v. primijenjene koncentracije željeza i ekspresije *Bmp6* praćene u određenim vremenskim intervalima (0, 3 i 6 sati nakon primjene).

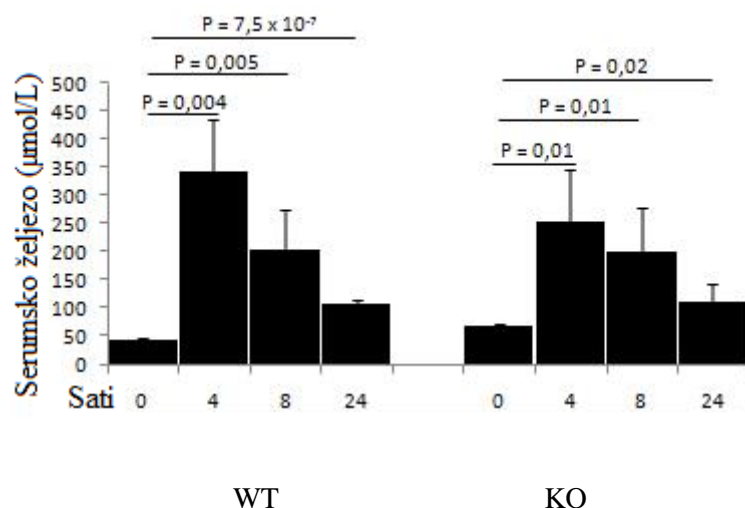


Slika 3: Utjecaj intravenski primijenjenog željeza na ekspresiju hepcidina u jetri.

Graf prikazuje utjecaj i.v. primijenjene koncentracije željeza na ekspresiju hepcidina u razdoblju neposredno nakon primjene, nakon 3 i nakon 6 sati (normalizacija s Gapdh).

Serumske vrijednosti željeza nakon njegove intravenske primjene

Serumske vrijednosti željeza mjerene su neposredno prije njegove intravenske primjene te 4, 8 i 24 sata nakon primjene. Tijekom prva četiri sata, kod WT, kao i kod *Bmp6* KO miševa primijećen je nagli statistički značajan porast koncentracije željeza u serumu. S vremenom su se izmjerene vrijednosti počele proporcionalno smanjivati, što se povezuje s nakupljanjem željeza u različitim organima (slika 4).



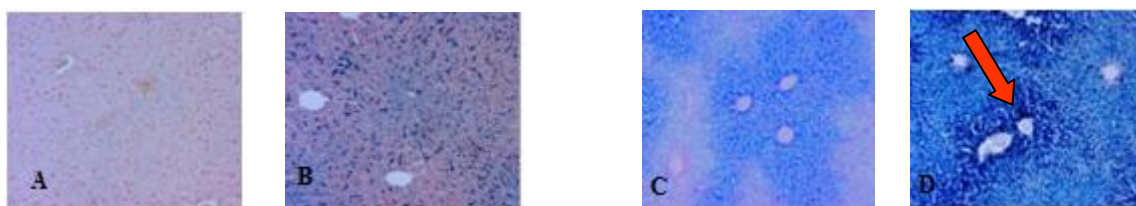
Slika 4: Serumske vrijednosti željeza u ovisnosti o vremenu koje je proteklo od njegove i.v. primjene.

Grafovi prikazuju promjene u koncentraciji serumskog željeza WT i *Bmp6* KO miševa neposredno prije primjene željeza te nakon 4, 8 i 24 sata.

Mikroskopske promjene tkiva jetre nakon intravenske primjene željeza

Nakon intravenske primjene željeza, pratili smo mikroskopske promjene tkiva jetre WT i *Bmp6* KO miševa. Uspoređivali smo ih s histološkom građom jetre kontrolnih WT i *Bmp6* KO životinja. Tkiva su analizirana četiri sata nakon primjene željeza. U kontrolnih WT miševa jetra je uredne građe (slika 5A). Kod WT miševa kojima je i.v. primijenjeno željezo, primjećuje se fokalno odlaganje željeza između tračaka hepatocita te u portalnim prostorima. Arhitektura tkiva uglavnom je očuvana (slika 5B). Analiza kontrolne skupine *Bmp6* KO miševa pokazuje znatno nakupljanje željeza i u citoplazmi hepatocita te oko centralne vene (slika 5C). Kod *Bmp6* KO miševa nakon primjene željeza nakupljanje je još masivnije. Difuzno zahvaća tkivo jetre te narušava normalnu građu režnjića i portalnih prostora. Uočava se nekroza perifernih hepatocita te centrolobularna nekroza (slika 5D). Prikazana struktura

tkiva jetre odgovara morfološkim značajkama hemokromatoze. Zbog organizacije krvotoka jetrenog reznjica u smjeru od portalnih prostora prema centralnoj veni, pri nižim serumskim koncentracijama željeza oštećeni su periferni hepatociti, a pri višim vrijednostima i centrolobularni (Junquera L.C, Carneiro J., 2005.), što se vidi na primjeru kontrolnih KO miševa i KO miševa kojima je primijenjeno željezo.



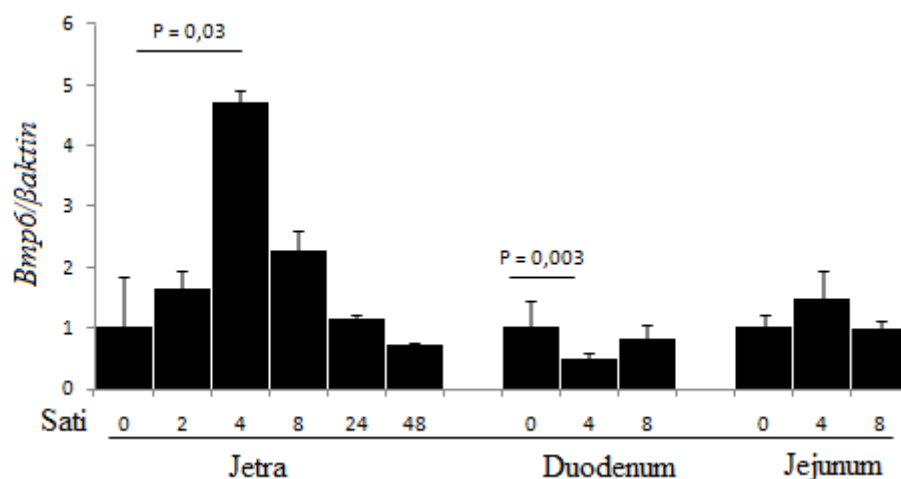
Slika 5: *Histološka analiza tkiva jetre.*

A) građa jetre kontrolnih WT miševa; B) tkivo jetre WT miševa 4 sata nakon i.v. primjene željeza; C) tkivo jetre kontrolne skupine Bmp6 KO miševa; D) jetra Bmp6 KO miševa 4 sata nakon primjene željeza. Bojenje je hemalaun-eozinom i berlinskim modrilom.

Utjecaj induciranog opterećenja željezom na ekspresiju *Bmp6* u jetri, duodenumu i jejunumu.

Nedavno je u radu autora S. Arndt, U. Maegdefrau i sur., u časopisu *Gastroenterology* (2009.) doi: 10.1053/j.gastro.2009.09.048. objavljeno da je pri induciranom opterećenju željezom glavno mjesto ekspresije *Bmp6* mRNA tanko crijevo. S obzirom na navedene rezultate, istražili smo i usporedili ekspresiju *Bmp6* u jetri, duodenumu i jejunumu WT miševa nakon i.v. primjene željeza. U jetri je četiri sata nakon primjene željeza zabilježen nagli statistički

značajan porast ekspresije *Bmp6*, u duodenumu je istovremeno zabilježeno smanjenje njegove ekspresije, dok u jejunumu nije došlo do statistički značajne promjene u ekspresiji toga gena (slika 6).

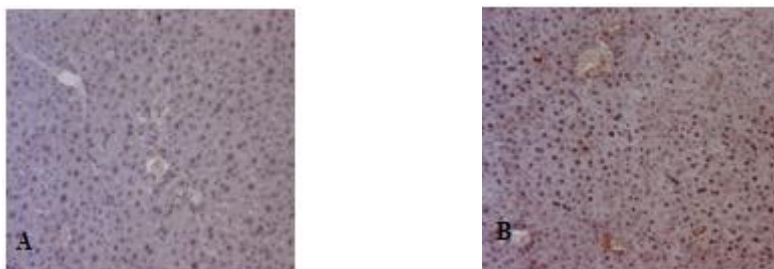


Slika 6: Ekspresija *Bmp6* u jetri, duodenumu i jejunumu.

Slika prikazuje ekspresiju *Bmp6* u jetri, duodenumu i jejunumu u naznačenim vremenskim intervalima nakon intravenske primjene željeza (normalizacija s β aktinom).

Imunodetekcijske metode

Tkivo jetre WT miševa analizirano je neposredno nakon intravenske primjene željeza te nakon osam sati. Za imunohistokemijsku analizu korišteno je poliklonsko protutijelo na cijelu BMP6 molekulu. Nakon osam sati ekspresija BMP6 proteina bitno je povećana, pa je zabilježena i značajna reakcija BMP6 s protutijelom (slika 7).



Slika 7: *Imunohistokemijska analiza tkiva jetre; A) imunohistokemijska reakcija neposredno nakon i.v.primjene željeza, B) 8 sati nakon i.v.primjene željeza.*

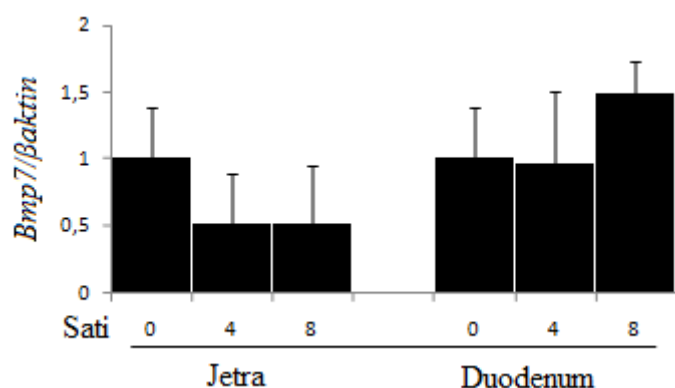
Nakon imunodetekcije BMP6 u tkivu jetre, metodom SDS-PAGE elektroforeze razdvojeni su proteini iz seruma WT miševa. Dio gela prenesen je na nitroceluloznu membranu i inkubiran s poliklonskim zečjim protutijelom na cijelu molekulu BMP6. U analiziranom uzorku seruma nije dokazano prisustvo molekule BMP6 niti u kontrolnih WT miševa, niti u WT miševa kojima je i.v.primijenjeno željezo (slika 8).



Slika 8: *Western blot. Analiza je rađena u kontrolnih WT miševa te onih kojima je primijenjeno željezo, u vremenskim intervalima od 9, 24 i 48 sati nakon primjene. BMP 6 molekula nije dokazana.*

Utjecaj induciranog opterećenja željezom na ekspresiju *Bmp7* u jetri

S obzirom na sličnost BMP6 i BMP7 molekula, istražili smo mogući utjecaj željeza na ekspresiju *Bmp7* gena u jetri i duodenumu. Ekspresija *Bmp7* analizirana je neposredno prije intravenske primjene željeza te četiri i osam sati nakon njegove primjene. U pokusu nije zabilježena statistički značajna promjena u ekspresiju *Bmp7* u jetri i duodenumu (slika 9).



Slika 9: Utjecaj i.v. primijenjenog željeza na ekspresiju *Bmp7* u jetri i duodenumu. Promjena se prati u vremenskim intervalima neposredno prije primjene te 4 i 8 sati nakon primjene željeza (normalizacija s β aktinom).

Proteomska analiza seruma WT i KO miševa nakon i.v. primjene željeza

Nakon razdvajanja proteina elektroforezom, dio gela bojan je Coomassie Brilliant Blue bojom te je svaki od šest gelova izrezan na još 15 dijelova. Provedena je digestija u gelu i pročišćavanje proteina iz gela kao priprema za analizu proteina LC-MS metodom. Analizirana je svaka dobivena vrpca, uključujući i vrpcu od 23 kDa (slika 10) za koji u svom radu autori Arndt i sur. tvrde da sadrži BMP6 molekul. Uspoređivani su rezultati kontrolnih WT miševa te onih kojima je i.v. primijenjena terapija željezom. Vrpca od 23 kDa generalno uključuje velik broj proteina koji su razdvojeni i identificirani LC-MS metodom, što je prikazano u tablici 2. Vidljivo je također kako nije dokazana prisutnost BMP6 molekula u uzorku seruma

kontrolnih WT miševa. BMP6 molekulu međutim ne nalazimo niti u serumu WT miševa izloženih induciranom opterećenju željezom, što upućuje na zaključak kako ove molekule u sistemskoj cirkulaciji nema u tako velikim količinama, već da vrpce dominantno čine visokozastupljeni proteini (tablice 2 i 3).



Slika 10: *Vrpca od 23 kDa; A) kontrola; B) WT miševi nakon i.v. primjene željeza.*

Tablica 2: *Proteini u serumu kontrolnih WT miševa, razdvojeni LC-MS metodom (Log E= log po bazi 10 od očekivane vrijednosti).*

Rank	log (e)	PROTEIN
1	-304	Alb, Serum albumin Precursor
7	-218,8	Pzp, Alpha- 2-macroglobulin Precursor
8	-214,9	Mup1, RIKEN cDNA 2610016E04 gene Gene
11	-172,6	Hbb-b1, Hemoglobin subunit beta1
12	-150,9	Ttr, transthyretin Gene
1	-81,5	Apoa1, Apolipoprotein A-I Gene
21	-68,5	Trf, Serotransferrin Precursor
22	-65,3	Mb, Myoglobin
23	-63,7	Acta2, Actin
24	-57,2	Fgg, Fibrinogen, Gamma polypeptide Gene
44	-36,4	Myh1, Myosin heavy chain
51	-31,5	Cp, Ceruloplasmin
58	-24,1	Igfbp3, Insulin-like growth factor binding protein 3
63	-21,4	Apolipoprotein, C-III Gene

81	-8,2	Immunoglobulin heavy chain IV gene segment
85	-6,8	Fn1, Fibronectin 1 Gene

Tablica 3: *Proteini u serumu WT miševa koji su primali i.v.terapiju željezom, razdvojeni LC-MS metodom (Log E= log po bazi 10 od očekivane vrijednosti).*

Rank	log (e)	PROTEIN
1	-100,2	Rbp4, Retinol binding protein 4
2	-90,9	Hbb-b1, Hemoglobin subunit beta1
7	-67,8	Ttr, transthyretin
9	-49,4	Alpha-2-macroglobulin Precursor
10	-46,8	Hba -a1, hemoglobin alpha, adult chain 1
13	-24,8	Apolipoprotein M
18	-10,4	Mb, Myoglobin

RASPRAVA

U navedenom radu proučavali smo mehanizme regulacije količine željeza u organizmu. Poznato je da se željezo najvećim dijelom apsorbira u duodenumu tankoga crijeva te se proces apsorpcije ujedno smatra i temeljnim homeostatskim mehanizmom regulacije željeza. Manjim dijelom ukupnoj količini željeza u organizmu, osim apsorpcije, pridonosi i endogeno željezo iz hemoglobina, mioglobina i citokroma c. Smatra se da temeljnu ulogu u regulaciji serumske koncentracije željeza ima hepcidin, peptidni hormon koji se sintetizira u jetri. Mehanizam njegovog djelovanja na staničnoj razini obuhvaća internalizaciju i degradaciju proteina feroportina, smještenog na bazolateralnoj membrani enterocita duodenuma i stanica retikuloendotelnog sustava. Budući da feroportin ima ulogu transportera željeza iz stanica u krv, djelovanjem hepcidina, transport željeza je inhibiran, a serumska mu se koncentracija smanjuje. Razina ekspresije hepcidina u novije se vrijeme dovodi u vezu s ulogom BMP molekula, što je u *in vivo* uvjetima potvrđeno za BMP6. Poznato je da povišena serumska razina željeza uzrokuje povećanje ekspresije *Bmp6* i *hepcidina*, no ima oprečnih mišljenja oko toga sintetizira li se BMP6 primarno u duodenumu ili u jetri.

U nedavno objavljenom radu autora Arndt S., Maegdefrau U., Dorn C., Schardt K., Hellerbrand C., Bosserhoff A.K., u časopisu „Gastroenterology“(2009.), navodi se da su epitelne stanice tankog crijeva glavno mjesto ekspresije *Bmp6* te da sintetizirane molekule BMP6 portalnom cirkulacijom naknadno dopijevaju u jetru gdje potiču ekspresiju *hepcidina*. Također, imunodetekcijskim metodama u serumu pokusnih WT miševa, dokazali su prisutnost zrelih molekula BMP6, što je ukazivalo na njihovu prisutnost u sistemske cirkulaciji.

S obzirom na navedene rezultate, u pokusima smo provjeravali učinak induciranog opterećenja željezom na ekspresiju *Bmp6* i *hepcidina* u jetri WT štakora. Intravenski smo

primijenili dozu željeza od 50, 100 i 200 mg/kg na tri eksperimentalne skupine od po 6 WT štakora te analizom genske ekspresije pokazali da do statistički značajnog povišenja ekspresije *Bmp6* dolazi nakon primjenjene koncentracije željeza od 200 mg/kg (mjereno šest sati nakon i.v. primjene). Paralelno s povišenjem ekspresije *Bmp6*, analizom genske ekspresije dokazali smo da dolazi i do povišenja ekspresije *hepcidina* u jetrenim stanicama. Može se zaključiti da su mehanizmi djelovanja BMP6 i hepcidina međusobno povezani. Dalje smo u radu pratili odnos između serumske koncentracije željeza i vremena koje je prošlo od i.v. primjene željeza u WT i *Bmp6* knockout miševa. Podaci dobiveni analizom krvi miševa prije i.v. unosa željeza te 4, 8 i 24 sata nakon unosa pokazuju najveću serumsku koncentraciju željeza 4 sata nakon apliciranja, posebno u WT miševa, gdje dolazi do statistički značajnog povećanja serumske koncentracije željeza, nakon čega se koncentracija počinje smanjivati i u WT i *Bmp6* knockout miševa, što se tumači akumulacijom željeza u različitim tkivima i organima. Važan dokaz o središnjoj ulozi BMP6 u regulaciji željeza potječe i iz rezultata histološke analize tkiva jetre WT i *Bmp6* KO miševa nakon induciranog opterećenja željezom. Naime, u WT miševa nalazimo samo mjestimično nakupljanje željeza, dok KO miševi razvijaju hemokromatozu. Morfološke promjene tkiva jetre tih miševa uključuju periportalnu i centrolobularnu nekrozu te nakupljanje željeza oko središnje vene. U radu smo također ispitali i usporedili ekspresiju *Bmp6* u jetri, duodenumu i jejunumu nakon i.v.unosa željeza. Zanimalo nas je jesu li jetrene stanice glavni izvor ekspresije *Bmp6* ili su to ipak epitelne stanice tankog crijeva, kako u svom radu navode Arndt i suradnici. Pratili smo promjenu genske ekspresije *Bmp6* u različitim vremenskim intervalima nakon i.v. unosa željeza. Naši rezultati pokazuju da do statistički značajnog povišenja ekspresije *Bmp6* dolazi u jetri i to 4 sata nakon unosa. Nismo dokazali porast ekspresije *Bmp6* u duodenumu i jejunumu WT miševa. Naime, čak je došlo i do blagog smanjena ekspresije *Bmp6* u duodenumu, dok u jejunumu nije zamijećena nikakva promjena u ekspresiji toga gena. Ovime zaključujemo da

su jetrene stanice glavni izvor BMP6 molekula uključene u mehanizam regulacije željeza. U prilog ovoj tezi govore i rezultati imunohistokemijskog bojenja uzoraka tkiva jetre WT miševa neposredno nakon i.v.unosa željeza te 8 sati nakon unosa. Imunohistokemijska reakcija poliklonskim protutijelom na cijelu BMP6 molekulu bila je pozitivna, čime je dokazana sinteza BMP6 u jetrenim stanicama. Također, ispitali smo prisutnost BMP6 molekula u sistemskej cirkulaciji. Analiziran je volumen seruma od 5 μ L. Metodom Western blot u uzorku nije dokazana prisutnost BMP6 molekula. Proteomskom analizom dokazano je da se BMP6 ne nalazi u sistemskej cirkulaciji u tako velikoj količini te da je njegova sinteza najvjerojatnije primarno ograničena na mjestu stvaranja i djelovanja, a to je jetra. S obzirom na sličnost BMP6 i BMP7 molekula, istražili smo i utjecaj induciranog opterećenja željezom na ekspresiju *Bmp7* u jetri i tankom crijevu. Rezultati su pokazali kako u jetri i u duodenumu WT miševa ne dolazi do povećanja ekspresije *Bmp7*, iz čega zaključujemo da BMP7 nema regulatornu ulogu u homeostazi željeza kao što ima BMP6.

Znanje o regulatornim ulogama BMP6 i hepcidina u homeostazi željeza te razumijevanje pojedinih mehanizama od velikog je kliničkog značaja. Uzimanje BMP6 ili BMP6 agonista može povećati serumsku razinu hepcidina, što se može iskoristiti u liječenju pacijenata s povišenom količinom željeza u tijelu, bilo da se radi o juvenilnom obliku (primarna hemokromatoza) ili sekundarnom. BMP6 antagonisti mogu biti značajni u liječenju pacijenata s anemijom kronične bolesti. Potrebno je i dalje istraživati ulogu BMP6 te detaljnije rasvijetliti njegovu interakciju s ostalim proteinima uključenim u regulaciju ekspresije hepcidina. Također, istraživanja bi trebala biti usmjerena na razjašnjenje mehanizama kojima željezo inducira ekspresiju *Bmp6* u jetri, što je još uvijek nepoznato. Takav pristup mogao bi biti od pomoći pri razvoju potencijalnih biomarkera za dijagnozu i praćenje bolesti kao i budućih terapijskih metoda.

ZAKLJUČAK

Nakon provedenih pokusa i mjerenja, dobiveni su zanimljivi rezultati vezani za homeostatske mehanizme regulacije željeza. S obzirom na to da su mehanizmi indukcije BMP6 željezom još uvijek nepoznati, daljnja bi se istraživanja trebala usredotočiti na razjašnjenje tih mehanizama. Navedena istraživanja od velike su kliničke važnosti za pacijente s hereditarnom hemokromatozom, kao i za one koji su sekundarno razvili bolest (npr. učestale transfuzije, parenteralna primjena željeza, masivna hemoliza). Bolje razumijevanje patogeneze i patofiziologije poremećaja metabolizma željeza omogućit će razvoj potencijalnih biomarkera koji će olakšati dijagnostiku i praćenje tijeka bolesti.

ZAHVALE

Najiskrenije se zahvaljujem mentoru i voditelju Laboratorija za mineralizirana tkiva, prof.dr.sc. Slobodanu Vukičeviću što mi je omogućio aktivni laboratorijski rad i znanstveni angažman.

Iskreno zahvaljujem dipl.ing. Martini Pauk i dipl.ing. Igoru Erjavecu iz Laboratorija za mineralizirana tkiva Zavoda za anatomiju na velikoj podršci i pomoći pri pisanju rada te pruženim savjetima. Zahvaljujem i na tome što su me uveli u laboratorijske vještine.

Zahvaljujem se i prof.dr.sc. Lovorki Grgurević na svim savjetima i svoj pruženoj pomoći tokom zadnjih pet godina mog boravka u Laboratoriju za mineralizirana tkiva na Medicinskom fakultetu. Za pomoć kada je najviše trebalo!

Zahvaljujem se i kolegicama Ivi Topalušić i Ivoni Šulc s kojima sam osvojio Rektorovu nagradu za ovaj rad 2011. god.

POPIS LITERATURE:

- 1) Arndt S., Maegdefrau U., Dorn C., Schardt K., Hellerbrand C., Bosserhoff A.K., Iron induced expression of BMP6 in intestinal cells is the main regulator of hepatic hepcidin expression in vivo, *Gastroenterology* (2009.) doi: 10.1053/j.gastro.2009.09.048
- 2) Babitt J.L., Huang F.V., Yin X., Sidis Y., Andrews N.C., Lin H.Y., Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *J.Clinic. Invest.*,117: 1933- 1939 (2007) doi:10.1172/ JC131342
- 3) Camaschella C., Roetto A., Cali A., The gene TFR2 is mutated in the new type of hemochromatosis mapping to 7q22, *Nature Genetics*, 2000, 25:14-15
- 4) Cox, J. & Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol*, 2008, 26, 1367-1372
- 5) Craig, R. & Beavis, R. C. TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra. *Bioinformatics*, 2004, 20, 1466-1467
- 6) Damjanov I., Jukić S., Nola M., *Patologija, Medicinska naklada*, Zagreb, 2011.
- 7) Gamulin S., Marušić M., Kovač Z. i sur., *Patofiziologija, Medicinska naklada*, Zagreb, 2011
- 8) Grgurevic L. i suradnici, Urine release of systemically administered bone morphogenetic protein hybrid molecule. *J Nephrol* 2007, 20:311-319
- 9) Hogan BL (1996) Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Gen Dev* 6: 432-8 Hsu DR, Economides AN, Wang X, Eimon PM, Harland RM (1998) The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities.*MolCell*1:673-683

- 10) Junqueira L.C, Carneiro J., Osnove histologije, Školska knjiga, Zagreb, 2005.
- 11) Kall, L.; Storey, J.D. & Noble, W.S. QVALITY: non parametric estimation of q-values and posterior error probabilities. *Bioinformatics*, 2009, 25, 964-966
- 12) Kautz L., Besson Fournier C., Meynard C., Latour C., Roth M.P., Coppin H., Iron overload induces Bmp6 expression in the liver but not in the duodenum. *Haematologica*.2010. doi:10.3324/haematol. 2010.031963
- 13) Kemna E.H.J.V., Tjalsma H., Willems H.L., Swinkels D.L., Heparin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica*, 2008., Jan; 93:(1) 90-97. doi:10.3324/haematol.11705
- 14) Kingsley DM (1994) What do BMPs do in mammals? Clues from the mouse short-ear mutation. *Trends Genet* 10:16-21
- 15) Kingsley DM (1994) The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8:133-146
- 16) Knutson M., Wessling-Resnick M., Iron metabolism in the reticuloendothelial system, *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2003; 38:61-88
- 17) Krause A. i suradnici, 2000., LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett.* **480**:147-150
- 18) McKie AT, Barlow DJ, The SLC 40 basolateral iron transporter family (IREG1/ferroportin/MTP1, *Pflugers Arch*, 2004; 447:801-806
- 19) Meynard D., Kautz L. , Darnaud V., Carnonne- Hergaux F., Coppin H., Roth M.P., Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nature Genetics*, 2009., Jan., doi:10.1038/ng.320
- 20) Nemeth, E. i suradnici, 2004. IL-6 mediates hypoferremia af inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin, *J.Clinic. Invest.* **113**:1271-1276

- 21) Olsen J.V. i suradnici, Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4:2010-2021
- 22) Oudit GY, Sun H, Trivieri MG i suradnici, L-type Ca^{2+} channels provide a major pathway for iron entry in cardiomyocytes in iron overload cardiomyopathy, *Nat Med*, 2003, 9:1187-1194
- 23) Park, C.H., Valore, E.V., Waring, A.J., Ganz, T., 2001. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver, *J. Biol. Chem.* **276**:7806-7810
- 24) Pigeon C., Ilyin G., Coursaud B., Leroy P., A new mouse liver specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide heparin, is overexpressed during iron overload. *J. Biol. Chem* 2001;7811-7819
- 25) Rappsilber Juri, Mann Matthias, Ishihama Yashusi, Protocol for micro-purification, enrichment, prefractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips, *Nature protocols-electronic edition*, vol2, No.8, 2007 (1896-1906)
- 26) Sakou T (1998) Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone* 22: 591-603
- 27) Simic P., Culej J.B., Orlic I., Grgurevic L., Draca N. i suradnici, Systemically administered bone morphogenetic protein 6 restores bone in aged ovariectomized rats by increasing bone formation and suppressing bone resorption. *J. Biol. Chem*, 2006; 281: 25509-25521
- 28) Vukicevic S, Stavljenic A, Pecina M (1995) Discovery and clinical application of bone morphogenetic proteins. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 33: 661-671

ŽIVOTOPIS

Student sam 6. godine Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Fakultet sam upisao u akademskoj godini 2008./2009. Od druge godine studija aktivno sam uključen u znanstveni rad u Laboratoriju za mineralizirana tkiva na Zavoda za anatomiju. Sudjelovao sam u radu na projektima „Utjecaj željeza na koštani metabolizam u Bmp6 -/- miša“ koji je predstavljen na 6. hrvatskom i 1. regionalnom kongresu o osteoporozi, Rovinj, 31.03.-03.04.2011. te " Loading with iron modulates BMP6 in blood", 8th International Conference on Bone Morphogenetic Proteins, 15-18 rujna, 2010 Leuven, Belgija.

Tomo Svaguša

